



関西学院大学リポジトリ

Kwansei Gakuin University Repository

線虫の咽頭にサイズ異常を示す新規変異体の分離と解析

著者	小柴 優実
発行年	2018
URL	http://hdl.handle.net/10236/00027987

線虫の咽頭にサイズ異常を示す新規変異体の分離と解析

関西学院大学大学院理工学研究科
生命科学専攻 西脇研究室 小柴 優実

【研究目的】動物の器官は、それぞれ適切なサイズをしており、このサイズが器官の正常な機能に重要である。動物の発生における個体のサイズ制御機構については知見が得られつつあるが、器官サイズの制御メカニズムはまだほとんど解明されていない。*C. elegans* の咽頭は筋肉、神経、分泌腺などを含む 62 個の細胞からなる器官である。キチン結合ドメインを持つ分泌型タンパク質をコードする *pqn-74* 遺伝子の変異体は、体長は野生型と変わらないが咽頭のサイズが長くなる表現型を示す。野生型に変異原処理を施し咽頭のサイズが長い変異体のスクリーニングではこの *pqn-74* 遺伝子の変異が分離されることが多い。*pqn-74* 遺伝子を過剰発現すると咽頭の短縮が起こることが分かっている。そこで、*pqn-74* 過剰発現株から咽頭が長くなる変異体を分離することによって、*pqn-74* 遺伝子以外の変異体の分離を試みた。合計 5 株の変異体(*tk175*、*tk177*、*tk178*、*tk179*、*k2*) を分離した。本研究ではこれらの変異体の原因遺伝子を同定することにより、咽頭サイズの制御について調べる事を目的とする。

【実験方法】野生型に *pqn-74* 遺伝子を多コピー導入し(*tkIs21*)、咽頭サイズが短くなっている株に、EMS(エチルメタンスルホン酸)によって変異原処理を施し、顕微鏡下で咽頭サイズに異常を示す株を 5 株分離した。バッククロスにより、これらの株から *tkIs21* を取り除いた。このうちの 1 つの *tk175* 変異体は咽頭が波打つ表現型を示しており、本研究室で分離されていた *tk133* 変異体と表現型が類似していた為、*tk133* 変異体と相補性テストを行った。*tk178* 変異体は、咽頭サイズが長くなる表現型に加え、生殖巣の蛇行の表現型も確認できた。この表現型は本研究室で分離されている *mig-17* 変異体の表現型と類似していた為、相補性テストを行った。また *tk177* 変異体、*tk178* 変異体、*tk179* 変異体について、SNP (Single Nucleotide Polymorphism) mapping を行った。これは SNP(一塩基多型)を染色体中に多数持つ Hawaiian(CB4856)株と調べたい変異体株(Bristol 株)とを掛け合わせ、遺伝的組み換え体における SNP の分離を調べ、原因遺伝子の染色体上の領域を限定する方法である。また、*tk177* 変異体は次世代シーケンスによる原因遺伝子の絞り込み、それらの遺伝子をカバーする fosmid クローンでのレスキュー実験、原因遺伝子の欠損株との相補性テストを行った。

【実験結果と考察】*tk133* 変異体と *tk175* 変異体は相補しなかった為 *tk175* 変異体は *tk133* 変異体と原因遺伝子が同じであると考えられる。一方、*mig-17*(*k174*)変異体と *tk178* 変異体のは相補した為、*tk178* 変異体は *mig-17* と似た表現型を示すが異なる遺伝子の変異であると考えられる。また、*tk177* 変異体、*tk178* 変異体の SNP mapping の結果、どちらも Bristol 由来のバンドは II 番染色体に多く確認できた。*tk178* 変異体は II 番染色体の左右いずれかの端に位置する可能性が高いと考えられる結果となった。*tk177* 変異体は Genetic position 0.14~3.44 の間に Bristol 由来のバンドを確認することができた。次世代シーケンスにより、この領域内で変異を持つ遺伝子を絞り込むと、*T19D12.1*、*F32A5.2*、*T05H10.1*、*dab-1*、*T26C5.3* の 5 つであった。これらの遺伝子をカバーする fosmid クローンによるレスキュー実験を行ったところ、*dab-1* および *T26C5.3* を含む fosmid では咽頭長の表現型がレスキューされた。そこで *dab-1* と *T26C5.3* の変異株を NBRP より取り寄せ、観察したところ *T26C5.3* 変異体は *tk177* 変異体と非常によく似た表現型を示した。相補性テストの結果、相補しなかった為、*tk177* 変異体の原因遺伝子は *T26C5.3* であると結論した。この遺伝子を *phal*(pharynx length abnormal)-5 と命名する。*tk179* 変異体は SNP mapping が難航しており、染色体の同定はできていない。また、*k2* は成長速度が極端に遅く *pqn-74* 遺伝子過剰発現のために導入した *tkIs21* を交配によって取り除くことが難しい状態である。